

UNIVERSITÉ DE GENÈVE FACULTÉ DES SCIENCES
Laboratoire de Chimie inorganique et organique
Professeur K.-H. MEYER

**Méthodes perfectionnées
de purification et de cristallisation
d'alpha-amylases**

THÈSE

PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE GENÈVE
POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES CHIMIQUES

par

ERIC STEIN

DE GENÈVE

INGÉNIEUR-CHIMISTE
ASSISTANT AU LABORATOIRE DE CHIMIE ORGANIQUE
ET PHARMACEUTIQUE DE L'UNIVERSITÉ DE GENÈVE

Thèse N° 1220

GENÈVE
IMPRIMERIE KUNDIG
1954



Digitized by the Internet Archive
in 2026

**Méthodes perfectionnées
de purification et de cristallisation
d'alpha-amylases**

THÈSE

PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE GENÈVE
POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES CHIMIQUES

par

ERIC STEIN

DE GENÈVE

INGÉNIEUR-CHIMISTE
ASSISTANT AU LABORATOIRE DE CHIMIE ORGANIQUE
ET PHARMACEUTIQUE DE L'UNIVERSITÉ DE GENÈVE

Thèse N° 1220

GENÈVE
IMPRIMERIE KUNDIG
1954

*La Faculté des Sciences, sur le préavis de M. le
Professeur E. Cherbuliez, autorise l'impression de la
présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propo-
sitions qui y sont énoncées.*

Genève, le 11 mars 1954.

Le Doyen:

Paul-E. WENGER.

Thèse n° 1220.

A MES CHERS PARENTS

en hommage filial



Les recherches faisant l'objet de la présente thèse ont été effectuées au cours des années 1952 et 1953, dans les laboratoires de Chimie organique et inorganique de l'Université de Genève, sous la direction du Dr Ed.-H. Fischer, privat-docent, que je remercie très vivement pour les conseils et l'aide qu'il m'a toujours prodigués.

Je tiens à adresser ici une pensée émue à la mémoire du Professeur K.-H. Meyer, sous la haute direction duquel ma thèse avait débuté.

Mes remerciements vont également au Professeur E. Cherbuliez, qui a bien voulu accepter de présenter cette thèse à la Faculté des Sciences.



INTRODUCTION.

Au cours de ces vingt dernières années, l'étude des protéines a pu faire des progrès considérables grâce à l'apparition d'une multitude de techniques nouvelles et très variées. C'est ainsi que l'homogénéité, le poids moléculaire, la structure interne, la forme et la charge d'un grand nombre de protéines ont pu être déterminés par des méthodes physico-chimiques telles que la diffraction des rayons X, l'ultracentrifugation, l'électrophorèse, etc. Les techniques chromatographiques modernes ont permis d'élucider leur composition, notamment leur teneur en acides aminés; enfin, par l'utilisation de méthodes chimiques et enzymatiques, on a pu déterminer le nombre et la forme des chaînes peptidiques, leurs groupes terminaux et jusqu'à la séquence complète des acides aminés qui les constituent.

Pourtant, si des techniques perfectionnées permettent de travailler sur de très faibles quantités de substances, il faut effectuer tant d'analyses différentes et déterminer un si grand nombre de propriétés pour caractériser complètement une protéine aujourd'hui, qu'en définitive ces recherches sont encore limitées principalement par la quantité de protéines pures dont on peut disposer. Aussi le but de ce travail a-t-il été

de mettre au point des méthodes de purifications simples et courtes, sûres et parfaitement reproductibles, qui permettent d'obtenir avec un rendement favorable quatre α -amylases cristallisées d'origines très différentes: les α -amylases de SALIVE HUMAINE, PANCRÉAS DE PORC, *ASPERGILLUS ORYZAE* (Takadiastase) et *BACILLUS SUBTILIS*.

Chacune des quatre méthodes de purification est décrite avec suffisamment de détails pour qu'il soit possible de cristalliser l'enzyme à coup sûr, sans avoir recours à des cristaux d'amorçage. Les purifications ne durent que deux à trois jours. Elles aboutissent à une quantité de cristaux de l'ordre du gramme.

La purification et la cristallisation des α -amylases de pancréas de porc^{1 2}, salive humaine³ et *Aspergillus oryzae*⁴ ont déjà fait l'objet de publications émanant de ce laboratoire. Nous avons modifié ces méthodes afin de les abréger et de les améliorer. Par contre, la purification de l' α -amylase de *B. subtilis*, que nous décrivons ici, est nouvelle⁵.

I. TECHNIQUE GÉNÉRALE DES PURIFICATIONS

Les quatre purifications suivent une même ligne générale:

- 1° Extraction aqueuse de l'enzyme à partir d'une poudre;
- 2° Précipitations fractionnées par l'acétone et/ ou le sulfate d'ammonium;
- 3° Dialyse;
- 4° Cristallisation de l'enzyme à partir d'un précipité acétonique.

Par souci de concision, nous avons groupé ici les descriptions détaillées des opérations communes à plusieurs purifications;

¹ K. H. MEYER, Ed. H. FISCHER et P. BERNFELD, *Helv.*, **30**, 64-78 (1947).

² Ed. H. FISCHER et P. BERNFELD, *Helv.*, **31**, 1831-44 (1948).

³ K. H. MEYER, Ed. H. FISCHER, A. STAUB et P. BERNFELD, *Helv.*, **31**, 2158-72 (1948).

⁴ Ed. H. FISCHER et R. DE MONTMOLLIN, *Helv.*, **34**, 1987-99 (1951).

⁵ J. FELLIG, E. A. STEIN et Ed. H. FISCHER, à paraître dans *Helv.*, **37** (1954).

elles ne figureront plus dans les chapitres traitant des purifications individuelles.

1. Conditions de travail.

Du fait de l'instabilité des enzymes en cours de purification, il est indispensable d'observer rigoureusement un certain nombre de précautions:

- a) Emploi exclusif d'eau distillée dont la pureté a été contrôlée (notamment pour rincer la verrerie de laboratoire);
- b) Travail à l'abri des vapeurs de laboratoire;
- c) Utilisation de produits *pro analysi* (sels, solvants, etc.);
- d) Maintien de l'enzyme entre 0 et 5° C;
- e) Contrôles fréquents du pH (on peut se servir de papiers indicateurs colorés Lyphan, Vaduz, Lichtenstein, par exemple). Lorsqu'on ajuste le pH, il faut éviter tout excès local d'acide ou de base;
- f) Observation des horaires indiqués: les purifications ne doivent pas être interrompues. L'ordre des opérations est fixe, il ne saurait être inversé.

2. Extraction.

La poudre d'enzyme en suspension aqueuse est abandonnée à froid, pendant une nuit (12-15 heures), sur une secoueuse lente (une agitation trop brusque peut provoquer une certaine coagulation des protéines, ce qui entraîne une diminution de l'activité enzymatique). Après centrifugation, on décante la liqueur surnageante qui contient l'enzyme (*extrait brut*) et rejette les culots.

3. Agents précipitants: acétone et sulfate d'ammonium.

- a) L'acétone est traitée pendant 24 heures à froid par 4 gr/l de KMnO_4 + 6 gr/l de Na_2CO_3 , puis distillée avec une colonne de fractionnement sur Na_2CO_3 . Titre: 98%;

b) La solution saturée de *sulfate d'ammonium* (SAS) est ajustée à pH 7 par NH_4OH conc. On la conserve à froid; elle doit être limpide et incolore et reposer sur une couche de SA solide. Elle contient:

41,5 gr SA/100 gr de solution saline à 0° C
ou 51,2 gr SA/100 cm^3 » » » » (3,875 M).

On admet que la teneur en SA d'un culot de centrifugation (exprimé en centimètres cubes de SAS) s'obtient en multipliant le volume du culot par la concentration finale de la solution en agent précipitant.

Dans la suite du travail, les concentrations *finales* en agent précipitant seront indiquées entre parenthèses, exprimées en *pour cent* pour l'acétone et en *fraction de saturation* pour le SA ¹.

4. Technique des précipitations.

A défaut de thermostats à basse température, les précipitations se font en bechers entourés de glace fondante et sous agitation mécanique. L'agitateur doit être de dimensions telles qu'il brasse *toujours toute* la solution.

a) Pour les *fractionnements acétoniques*, on ajoute l'agent précipitant en *fine pluie* (pour diminuer l'échauffement dû à la chaleur de dilution de l'acétone). On peut simplement utiliser quatre entonnoirs à robinet terminés en capillaire, ou, mieux, se servir d'un dispositif constitué par un tube de verre (de dimension appropriée au diamètre du becher)

¹ Formules pour le calcul des concentrations finales en agents précipitants:

a) pour l'acétone: $\frac{T x}{x + y} = C$

b) pour le SA saturé: $\frac{x}{x + y} = C$ (la conc. du SAS = 1)

b') pour le SA solide: $\frac{1,955 z}{y + 0,544 z} = C$

C = concentration finale

T = titre (98%)

x = volume en centimètres cubes de l'agent précipitant

y = volume initial en centimètres cubes de la solution à précipiter

z = poids en grammes du SA solide.

dans lequel on a étiré une dizaine de fins capillaires. Le débit de l'acétone peut être plus rapide à la fin de la précipitation qu'au début. On maintient toujours l'agitation (80 à 100 t/min) pendant 15 minutes après chaque précipitation.

- b) Les *précipitations au SAS* doivent se faire rapidement (100 cm³ SAS/min) sous agitation efficace (200 t/min). Le SAS contenu dans un cylindre gradué est ajouté à la solution en un filet. Lorsque la précipitation doit être arrêtée au « premier trouble »¹, il faut utiliser une burette pour additionner l'agent précipitant. Dans le cas d'une précipitation en présence de NaCl (« Mixed-Salt Precipitation »), on opère *sans* bain de glace et en centrifugeuse *non* réfrigérée afin d'éviter la cristallisation de Na₂SO₄; le SAS et la solution saturée de NaCl sont cependant introduits à *froid* dans la solution d'enzyme. La température ne devrait jamais dépasser 18° C.

5. Centrifugations.

Les centrifugations se font en centrifugeuses réfrigérées. Pour les suspensions acétoniques, une centrifugation en tubes fermés de 10 à 15 minutes correspondant à 1500-2000 g suffit tandis qu'il faut en général 30 minutes de centrifugation à 25.000-30.000 g pour les précipitations au SA (par ex. « Spinco Model L preparative Ultracentrifuge », Belmont, Californie U.S.A.).

6. Dissolution des culots.

La dissolution s'effectue en *triturer* longuement ($\frac{1}{4}$ h.-1 h.) les culots avec une baguette de verre dans une *faible* quantité *connue* d'eau *glacée*, ce qui permet de déterminer leur volume (cylindre gradué). Lorsqu'il faut redissoudre l'enzyme dans un très faible volume d'eau, on a avantage à centrifuger plusieurs fois dans les mêmes tubes, de façon à n'avoir qu'un petit nombre de culots. On extrait ceux-ci des tubes à la

¹ Pour établir à partir de quel moment la *turbidité persistante* s'est étendue à toute la solution (= premier trouble), il faut travailler en récipients transparents et sous éclairage adéquat.

spatule, les réunit et les dissout dans les eaux de rinçage des tubes. Le rendement des purifications dépend beaucoup du soin avec lequel on rince et égoutte les tubes à centrifuger.

7. *Dialyses.*

Les dialyses se font à froid (5° C) en présence de 2-3 gouttes de toluène contre 100 volumes d'eau contenant 0,5 gr/l d'acétate de Ca et 1 cm³/l de NH₄OH N. On augmente l'efficacité de la dialyse en donnant une surface maximum aux « sacs à dialyse » (membrane Visking, Chicago, Ill., U.S.A.): avant de les fermer, on les aplatit entre deux treillis de nylon enserrés dans un cadre en acier inox. Ce dispositif est suspendu à un axe vertical en rotation de sorte que l'eau est brassée par la membrane elle-même. La dialyse peut ainsi être réduite à une nuit.

8. *Cristallisation.*

On ajoute 1 gr/l d'acétate de Ca à la solution d'enzyme dialysée et la précipite *d'un coup* (agitation: 200 t/min) par 2,5 volumes d'acétone préalablement refroidie à — 20° C. Après 15 minutes d'agitation, on centrifuge et égoutte soigneusement le culot d'enzyme en tenant le tube renversé pendant 2 minutes. La dissolution se fait dans le tube à centrifuger. En vue de la recrystallisation, la solution obtenue peut être transvasée à la pipette dans un tube à centrifuger plus petit (*en verre*). Après avoir ajouté 2-3 gouttes de toluène (antiseptique), on ferme hermétiquement le tube avec un bouchon de caoutchouc et l'abandonne à froid sur une secoueuse lente ¹.

9. *Recrystallisation* ².

Il est préférable d'attendre deux semaines avant de recrystalliser la protéine: on écarte les eaux-mères par centrifugation énergique, suspend rapidement le culot cristallin dans environ

¹ L' α -amylase d'*Aspergillus Oryzae* est trop soluble pour pouvoir cristalliser ainsi. Voir cette purification.

² Avant de dissoudre les cristaux, il est bon d'en prélever une petite fraction que l'on conserve comme *cristaux d'amorçage* pour accélérer les cristallisations futures.

trois volumes d'une solution glacée d'acétate de Ca M/100, centrifuge tout de suite et répète le lavage. (Eaux-mères et eaux de lavage pourront être jointes à la solution d'enzyme obtenue à la fin du premier stade d'une prochaine purification). Le culot cristallin est alors additionné de NH_4OH dilué; on agite de temps à autre jusqu'à dissolution totale (1-3 heures; contrôler au microscope). Après avoir éliminé les impuretés insolubles par centrifugation, on ajuste avec précaution le pH de la solution à 6,8 au moyen de CH_3COOH N/5, dissout environ 2 mg/cm^3 d'acétate de Ca *pro analysi* et abandonne le tube comme ci-dessus. En l'absence de Ca, le rendement des recristallisations successives baisse de plus en plus: après trois ou quatre recristallisations, l'enzyme finit par ne plus cristalliser du tout.

Conservation des cristaux: Il faut veiller à ce que le toluène ne s'épuise pas. Après une demi-année, il est bon de recristalliser. Si l'on veut conserver l'enzyme purifié pendant de longues périodes, on peut *lyophiliser* ses solutions (pH 7-7,2). L'amyase supporte ce traitement sans désactivation si l'on a soin, lors de la redissolution de la protéine sèche, de refroidir préalablement la poudre d'enzyme à 0° ou -10° C et d'utiliser de l'eau glacée afin de diminuer l'effet de la chaleur d'hydratation.

10. Test de pureté.

Le degré de pureté ou *activité spécifique* est donné par le rapport activité amylatique/teneur en azote protéique¹. On peut contrôler la pureté de l'enzyme cristallisé en comparant l'activité spécifique des eaux-mères à celle des cristaux; ces deux valeurs doivent se rejoindre après 2-3 cristallisations.

11. Dosage de l'activité amylatique (facultatif).

Si l'on veut contrôler la conservation et la répartition de l' α -amyase au cours de la purification, il faut effectuer les dosages *le jour même*, avant et après chaque opération (précipitations, dialyse, etc.) aussi bien sur la fraction enrichie que

¹ L'azote est dosé selon Kjeldahl après élimination de NH_3 par distillation sur MgO .

sur la partie à rejeter (culot, liqueur surnageante). Ces dosages n'ont rien d'absolu: on obtient souvent des valeurs anormales. Voir à ce sujet le ch. VII, 4^o, p. 159.

L'*unité d'activité* est la quantité d'enzyme qui produit 1 mg de « maltose » (dosé par la méthode colorimétrique à l'acide 3,5-dinitrosalicylique¹) en 3 minutes à 20° C à partir d'une solution à 1% d'amidon soluble².

II. AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS DES QUATRE PURIFICATIONS

1. *Matériel de départ.*

La *salive* est un matériel de départ qui a le double avantage de rendre l'« extraction » superflue et d'être toujours à disposition. Sa récolte est cependant fastidieuse puisqu'il en faut presque 2 litres par purification et qu'une personne fournit difficilement plus de 100 cm³ de salive en une demi-journée.

Le produit de départ des amylases *fongique* et *bactérienne* sont des poudres industrielles dont la composition est peut-être moins constante que celle d'un matériel naturel; par contre elles ont l'avantage d'être déjà suffisamment concentrées en amylase pour que l'on puisse renoncer aux précipitations acétoniques fractionnées.

L' α -amylase de *pancréas de porc* peut aussi bien être purifiée à partir de la glande fraîche qu'à partir d'un produit industriel. La première méthode est cependant passablement plus longue.

2. *Rendement.*

A cause de la faible concentration de l'enzyme dans la *salive* et de l'importance des volumes impliqués, une purification

¹ Cf. K. H. MEYER, Ed. H. FISCHER et P. BERNFELD, *Helv.*, 30, p. 73 (1947) et G. NOELTING et P. BERNFELD, *Helv.*, 31, p. 286 (1948).

² Comme substrat, on peut employer à la place de l'amidon Zulkowsky l'amidon soluble « Noredux » Standard (Siegfried A.G., Zofingue, Suisse) à 1% et M/150 en NaCl (sauf pour la Takadiastase qui n'a pas besoin d'ions Cl pour manifester son activité). On effectue les dosages au pH correspondant à l'optimum d'activité. Le substrat sera donc tamponné aux phosphates M/50 à pH 6,9 pour les α -amy-

d' α -amylase de salive donne cinq à dix fois moins de cristaux (~ 150 mg) que les purifications des trois autres amylases qui permettent chacune d'obtenir environ 1 gr d'enzyme cristallisé¹. L'activité spécifique de l'amylase de salive cristallisée est cependant trois fois plus grande que celle de la Takadiastase et une fois et demie supérieure à celle du pancréas de porc.

3. Stabilité en cours de purification².

Plus cette stabilité est faible, plus la purification devient délicate. Ainsi l' α -amylase de salive est assez instable, celle de pancréas de porc très instable. L'amylase bactérienne et surtout la Takadiastase sont relativement stables.

4. Centrifugations.

Il n'est pas nécessaire de disposer d'une centrifugeuse dont la force dépasse 2000 g pour purifier l' α -amylase de pancréas de porc. 4000 g peut à la rigueur suffire pour l' α -amylase de salive. La cristallisation de la Takadiastase, par contre, demande 100.000 à 150.000 g.

III. PURIFICATION ET CRISTALLISATION DE L' α -AMYLASE DE SALIVE HUMAINE³

Dans la salive, l'enzyme est stabilisé par des colloïdes protecteurs. Ceux-ci éliminés, il supporte mal la température

lases de salive et de pancréas; et à pH 6,5 pour l' α -amylase de *B. Subtilis*. Pour la Takadiastase, on maintient le pH du substrat à 5,7 à l'aide d'un tampon acétate.

¹ Ces quantités s'entendent pour la protéine à l'état lyophilisé et deshydraté à poids constant.

² La plus ou moins grande stabilité en cours de purification ne correspond pas tout à fait aux limites de stabilité en fonction du pH des enzymes purifiés:

L' α -amylase de salive	est stable entre les pH	4,5-11
» » pancréas	» » » »	6,5- 8,5
» » moisissure	» » » »	5,5- 8,5
» » bactérie	» » » »	5,0-11,5.

³ Cf. K. H. MEYER, Ed. H. FISCHER, A. STAUB et P. BERNFELD, *Helv.*, 31, 2158-72 (1948).

ordinaire et est très sensible aux impuretés. La purification exige des méthodes très douces; elle doit être poursuivie *sans interruption*.

Horaire.

Pendant les deux ou trois jours qui précèdent la purification:	Récolte de la salive.
Premier jour:	Premier fractionnement acétonique.
Deuxième jour:	Deuxième » » et précipitation au SAS.
Nuit:	Dialyse.
Troisième jour:	Cristallisation.

Rendement: On peut obtenir 100 mg d'enzyme cristallisé par litre de salive.

Rappel: Le chapitre I intitulé « Technique générale des purifications » est un complément *indispensable* à la bonne marche des opérations qui vont suivre.

Récolte de la salive.

On distribue à une douzaine de personnes un becher avec quelques cristaux de thymol (antiseptique) et on leur donne à mâcher un morceau de paraffine pure à bas point de fusion (50° C) (le chewing-gum est à déconseiller).

De temps en temps on collecte la salive, sans rincer les bechers, car *elle ne doit pas être diluée*, et la porte au frigorifique. Lorsqu'on en a obtenu 1,7 à 2 litres, on la centrifuge pendant 1 heure (2000 g) et rejette les culots. Si des particules de paraffine flottent encore à la surface de la liqueur surnageante, il faut la filtrer sur de la laine de verre préalablement lavée. La liqueur fluide, légèrement trouble, est conservée à froid, en présence de thymol, en flacon bouché. Elle est stable un mois au moins, mais il est préférable de ne pas la garder trop longtemps.

Premier fractionnement acétonique.

(voir ch. I, §§ 3a, 4a, 5 et 6, p. 133 à 135).

On précipite 1500 cm³ de salive centrifugée ¹ (pH 7-7,5) par 1400 cm³ d'acétone (48%) en 40 minutes, puis centrifuge. Les culots (mucoïdes) sont rejetés, tandis que la solution surnageante est précipitée par 2100 cm³ d'acétone (69%), toujours en 40 minutes. Après centrifugation, on rejette la solution surnageante, dissout les culots et les porte à 250 cm³ (pH 6,8). Ajouter quelques gouttes de toluène et conserver la liqueur à froid jusqu'au lendemain ².

Deuxième fractionnement acétonique

On précipite les 250 cm³ obtenus par 250 cm³ d'acétone (49%) en 20 minutes, centrifuge et rejette les culots qui sont peu importants. On dissout 1 gr d'acétate de Na dans la solution acétonique et la précipite par 330 cm³ d'acétone (69%) en 20 minutes. On centrifuge, rejette la solution surnageante, dissout les culots et porte la solution à 100 cm³ (pH 6,5) ³.

Précipitation au SAS

(voir ch. I, §§ 3b, 4b, 5 et 6, p. 134-5).

(L'enzyme étant instable en présence de SA, il faut agir vite.)

Les 100 cm³ du stade précédent sont ajustés à pH 6,8 et précipités en 20 secondes par 100 cm³ de SAS (pH 7; 0,5 sat), sous agitation efficace, maintenue pendant une demi-heure. On centrifuge (4000 g peuvent à la rigueur suffire mais le culot est alors peu consistant et risque de se détacher), rejette la liqueur surnageante et dissout les culots dans un minimum d'eau. On obtient un liquide visqueux dont le volume final ne doit pas dépasser 50 cm³ ⁴.

¹ Ordre de grandeur de l'activité amylatique de la salive: ~ 250 unités/cm³ (substrat: amidon Zulkowsky; cf. ch. I, § 11, p. 137).

² Le rendement en activité de ce stade est d'environ 90%.

³ Rendement de cette opération: $\sim 85\%$.

⁴ Rendement global de la précipitation au SAS et de la dialyse: $\sim 60\%$. La solution purifiée obtenue après dialyse renferme au moins 40% de l'activité de la salive brute de départ.

Dialyse.

Cette solution est alors dialysée ¹ (cf. ch. I, § 7, p. 136).

Cristallisation

(voir ch. I, § 8, p. 136).

Après précipitation acétonique, on triture le culot obtenu avec une baguette de verre puis chasse l'acétone par un courant d'air (5-10 minutes, température ordinaire). On ajoute alors goutte à goutte de l'acétate de Ca M/1000 ($\sim 3 \text{ cm}^3$; 0° C) en triturant le culot jusqu'à dissolution complète. Les cristaux apparaissent spontanément après quelques heures déjà.

Recristallisation

(Ch. I, § 9 p. 136).

Le culot cristallin obtenu après deux lavages est suspendu dans 2 cm^3 d'eau glacée. Pour le dissoudre, on élève le pH jusqu'à 10 avec quelques gouttes de NH_4OH N/5. Si on n'« amorce » pas la solution (pH 6,8), la recristallisation peut être plus lente que la première cristallisation.

IV. PURIFICATION ET CRISTALLISATION DE L' α -AMYLASE DE PANCRÉAS DE PORC ^{2 3}.

Stabilisation ⁴.

Pendant la purification, il est nécessaire de stabiliser l'enzyme au moyen d'une *solution calcique*: solution de 2,5 gr/l de gluconate de Ca (M/200) neutralisée à pH 7 par NH_4OH et conservée à froid.

¹ Voir note 4, page précédente.

² K. H. MEYER, Ed. H. FISCHER et P. BERNFELD, *Helv.*, **30**, 64-78 (1947).

³ Ed. H. FISCHER et P. BERNFELD, *Helv.*, **31**, 1831-44 (1948).

⁴ Cf. « Stabilisation de l' α -amylase de pancréas de porc », ch. VII, 1^o, p. 155.

Elimination des ions sulfate.

Contrairement aux autres α -amylases, l' α -amylase de pancréas de porc supporte mal la dialyse au cours de sa purification. On élimine alors les ions sulfate en les échangeant contre des ions acétate (solubles dans l'acétone) au moyen d'*amberlite IR-4b* ou *IR-45* (analyt. grade, de la « Resinous Prod. & Chem. Co. », Philadelphie, Penn.) préparée d'avance :

Agiter pendant 4 heures 100 gr d'*amberlite IR-4b* et 300 cm³ de HCl 4% puis laver 2-3 fois la résine avec 250 cm³ d'eau distillée. Chasser l'air en immergeant l'*amberlite* dans 250 cm³ d'eau et en faisant le vide pendant une demi-heure. Traiter ensuite la résine deux fois par 250 cm³ NH₄OH 4%, une fois par 250 cm³ CH₃COOH N, puis deux fois par 200 cm³ CH₃COONa 2N pendant 2 heures. Entre chaque traitement, laver le produit à deux reprises avec 300 cm³ d'eau. L'*amberlite* est finalement conservée sous l'eau. Au moment de s'en servir, on l'essore rapidement.

Produit de départ.

L'enzyme ne peut pas être directement extrait du pancréas frais: la glande doit d'abord être transformée en « poudre sèche », ce qui nécessite une suite d'opérations permettant d'obtenir en une semaine un produit *dégraissé et stable*, en quantité suffisante (~ 1 kg) pour une dizaine de purifications. Cette poudre sèche peut être remplacée par la « Non activated Hog Pancreas Powder » (provenant des « Viobin Labs », Monticello, Ill., U.S.A.) dont l'activité amylatique est légèrement plus élevée.

*Préparation de la poudre sèche.*a) *Dégraissage aux ciseaux.*

7 kg de pancréas de porc *frais* sont débarrassés des tissus graisseux qui les enrobent. Cette opération est facilitée lorsque les glandes sont préalablement refroidies à 0° C (il est sage de porter des gants de caoutchouc pour se protéger les doigts contre l'action des ferments protéolytiques).

b) *Obtention du brai.*

Les glandes dégraissées sont passées trois fois dans une machine à hacher; d'abord à travers un tamis dont les trous ont un diamètre de 3 mm, puis deux fois à travers un tamis de 1 mm. On obtient un brai liquide dont on évalue le volume (5-6 l) et le poids (5-6 kg).

c) *Extraction des graisses*¹ (0-5° C).

On ajoute au brai environ deux volumes d'acétone, agite pendant 6 heures à l'aide d'un agitateur en acier inox, décante et centrifuge la phase liquide (culot A). Le brai est placé dans une toile à filtrer et passé à la presse; le filtrat est centrifugé (culots B). Les solutions sont rejetées tandis que le résidu resté dans la presse, ainsi que les culots A et B sont désagregés à la main puis resuspendus dans 5 à 8 l d'acétone.

On fait ainsi encore deux extractions acétoniques, une extraction au mélange acétone-éther (1: 1) et deux extractions à l'éther. La poudre grossière ainsi obtenue est étendue en fine couche jusqu'à ce que l'éther se soit évaporé (6-12 heures à 15-20° C), puis déshydratée pendant 48 heures au vide poussé sur silicagel et enfin conservée à froid dans un récipient hermétique. Elle est stable au moins une année.

Horaire de la purification à partir de la poudre d'enzyme.

Avant-veille:	Extraction.
Premier jour:	Premier fractionnement acétonique.
Deuxième jour:	Deuxième » »
Troisième jour:	Deux précipitations au SAS, élimination des ions sulfate, cristallisation.

Remarque: Il ne faut pas interrompre la purification.

Rendement: 1 kg de glandes dégraissées aux ciseaux donne environ 150 gr de poudre sèche à partir desquels on peut obtenir 2 gr d'amylase cristallisée.

¹ La pureté des solvants « techniques » du commerce est suffisante pour l'extraction des graisses.

Rappel: Le chapitre I intitulé « Technique générale des purifications » est un complément *indispensable* à la bonne marche des opérations qui vont suivre.

Extraction.

Dans un poudrier de 2 l, on introduit:

- 110 gr de poudre sèche (ou de poudre « Viobin »)
- 110 gr d'acétate de Na
- 1600 cm³ d'eau
- 5 cm³ de toluène
- 5 gouttes de décanol.

Le poudrier est agité *doucement* pendant 36 à 48 heures sur une secoueuse lente. Ensuite on centrifuge pendant 1 heure (2000 g) et rejette les culots. L'*extrait brut* (pH $\sim$ 6,2) est relativement stable mais il est préférable de le purifier le plus rapidement possible.

Premier fractionnement acétonique

(cf. ch. I, §§ 3a, 4a, 5, 6, p. 133-5).

L'*extrait brut* ¹ ($\sim$ 1500 cm³) est porté à 3200 cm³ à l'aide de la « solution calcique » et précipité en 1 heure avec 3080 cm³ d'acétone (48%). On centrifuge, décante, rejette les culots (protéases) et reprécipite la solution surnageante par 2920 cm³ d'acétone (64%) en 45 minutes. On centrifuge à nouveau, rejette la liqueur surnageante, dissout les culots et les porte à 1400 cm³ par addition de solution calcique. La liqueur ainsi obtenue est additionnée de quelques gouttes de toluène et conservée à froid jusqu'au lendemain ².

Remarque: Vu l'importance des volumes impliqués, quatre entonnoirs ne suffiront pas à introduire l'acétone en *très fine pluie*. Le dispositif genre « douche » signalé au ch. I, § 4, s'im-

¹ L'ordre de grandeur de l'activité amylatique de l'*extrait brut* est de 1500 unités/cm³ (substrat: amidon Zulkowsky; cf. ch. I, § 11, p. 137).

² Rendement de cette opération: $\sim$ 80%.

pose. Si l'on ne dispose pas d'un matériel adéquat, ce fractionnement peut être effectué en deux fois, mais dans la même journée.

Deuxième fractionnement acétonique.

On ajoute aux 1400 cm³ du stade précédent 1240 cm³ d'acétone (46%) en 30 minutes, puis centrifuge. Les culots (globulines) sont rejetés. On dissout 1 gr de CH₃COONa dans la liqueur surnageante et la précipite en 30 minutes par 2090 cm³ d'acétone (69%). Après centrifugation, on rejette la liqueur surnageante, dissout et porte les culots à 400 cm³ avec la solution calcique ¹.

Première précipitation au SAS

(cf. ch. I, §§ 3b, 4b, 5, 6, p. 134-5).

On ajuste les 400 cm³ à pH 6,8 (NH₄OH N/2) et les précipite par du SAS ajusté à pH 7. Cette précipitation est délicate parce que d'une part l'agent précipitant doit être introduit rapidement (une précipitation goutte à goutte détruit une partie de l'enzyme) et d'autre part parce que la quantité exacte de SAS à ajouter doit être déterminée *au cours même de l'opération*: on ajoute le SAS contenu dans une burette à fort débit et dès l'apparition d'un « premier trouble persistant » (qui se forme généralement vers 0,25 sat), on détermine rapidement la teneur en SA de la solution ². On continue à précipiter la solution en ajoutant encore une quantité de SAS telle que la teneur en agent précipitant augmente de 0,08 sat ³, maintient l'agitation pendant une demi-heure, centrifuge et rejette la liqueur surnageante. On dissout les culots, détermine leur volume afin de connaître la teneur en SA pour la précipitation suivante et complète à 200 cm³ avec la solution calcique ⁴.

¹ Rendement de ce fractionnement: $\sim 85\%$.

² $\frac{x}{x+400}$ où x = nombre de centimètres cubes de SAS ajoutés.

³ Le calcul de la quantité de SAS à rajouter doit se faire rapidement car cette précipitation ne supporte aucune interruption prolongée.

⁴ Rendement de la précipitation: $\sim 70\%$.

Deuxième précipitation au SAS.

En procédant comme au stade précédent, on augmente de 0,04 le degré de saturation (tenir compte du sel présent au départ) correspondant au « premier trouble »; celui-ci apparaît plus vite — après addition de 20 cm³ de SAS, par exemple — car la solution est plus concentrée en protéine et contient déjà du SA. Le culot obtenu après centrifugation est dissous dans 100 cm³ d'eau ¹.

Elimination des ions sulfate.

Les 100 cm³ du stade précédent sont traités pendant 1 heure (agitation: 200 t/min) par 20 à 25 gr d'amberlite IR-4b chargée à l'acétate. Pendant l'échange des anions, le pH doit rester entre 6,5 et 8 (sinon, ajuster par CH₃COOH N/5). On décante ensuite la liqueur sur un *petit* filtre Buchner, épuise deux fois l'amberlite avec un minimum d'eau, verse la résine sur le filtre et l'essore au vide.

On répète l'opération avec une deuxième portion d'amberlite ¹.

Cristallisation

(voir ch. I, § 8, p. 136).

On précipite la solution d'enzyme ² débarrassée d'ions sulfate et soumet le culot acétonique obtenu à l'action d'un courant d'air (15-20° C) pendant 5 minutes. On ajoute alors quelques gouttes d'eau en tenant le tube incliné de façon à ce que l'eau ne recouvre pas le culot. On dissout le précipité d'enzyme *par petites portions* en les triturant l'une après l'autre dans la solution aqueuse. Dès que celle-ci se trouble, on rajoute 2-3 gouttes d'eau. Cette manière de faire permet de dissoudre l'enzyme *dans un minimum d'eau*.

A la fin de la dissolution, la liqueur devient généralement opalescente; on la soumet de nouveau à l'action d'un courant

¹ Rendement global de la deuxième précipitation au SAS et de l'échange des anions: $\sim 75\%$.

² Cette solution purifiée contient 30 à 40% de l'activité de l'extrait brut initial.

d'air pendant 2-3 minutes. Si après quelques heures de repos la solution se prend en gelée, on triture vigoureusement la masse et la dissout en élevant très prudemment le pH à 8-8,5 par quelques gouttes de NH_4OH N/5. S'il y a lieu, on chasse les dernières traces d'acétone par un courant d'air et ramène le pH de la solution à 6,8 au moyen de CH_3COOH N/5.

La solution d'enzyme est abandonnée sur une secoueuse lente jusqu'à la fin de la cristallisation (1-2 semaines).

Recristallisation

(voir ch. I, § 9, p. 136).

On porte avec précautions le pH à 9 au moyen de NH_4OH N/5 et, après dissolution des cristaux, ajuste de nouveau le pH à 6,8 puis dissout environ 2 mg/cm^3 d'acétate de Ca.

Si on ne l'« amorce » pas, la recristallisation est plus lente que la première cristallisation.

V. PURIFICATION ET CRISTALLISATION DE L' α -AMYLASE D'*Aspergillus oryzae* (TAKADIASTASE)¹.

Cet enzyme se caractérise par son *extrême solubilité*. La cristallisation ne peut se faire qu'en présence de sels.

Le matériel de départ est la « Clarase 900 concentrated » de Takamine Laboratory, Inc., Clifton, N.J., U.S.A. *La méthode de purification n'est valable que pour ce produit.*

La « Clarase » est très riche en α -amylase puisqu'elle se trouve déjà à plus de 25% de pureté par rapport à l'azote. Elle est parfaitement stable lorsqu'on la conserve à froid, au sec et à l'obscurité.

Horaire.

Veille au soir:	Extraction.
Premier jour:	Précipitation au SA solide., précipitation fractionnée au « Mixed-Salt ».

¹ Ed. H. FISCHER et R. DE MONTMOLLIN, *Helv.*, 34, 1987-99 (1951).

Nuit:	Dialyse.
Deuxième jour:	Précipitation fractionnée au « Mixed-Salt », ultracentrifugation et cristallisation.

Rendement: Une purification peut donner 1 gr d'enzyme cristallisé.

Rappel: Le chapitre I intitulé « Technique générale des purifications » est un complément *indispensable* à la bonne marche des opérations qui vont suivre.

Extraction

(voir ch. I, § 2, p. 133).

On suspend 60 gr de « Clarase » dans 375 cm³ d'eau et extrait l'enzyme en soumettant la suspension à une agitation douce pendant une nuit. On centrifuge ensuite pendant une demi-heure (2000 g) et décante la solution surnageante — très foncée — que l'on complète à 400 cm³ (pH 6-6,5) ¹.

Précipitation au SA solide

(cf. ch. I, §§ 3b, 4b, 5 et 6, p. 134-5).

On ajoute aux 400 cm³ d'extrait brut 210 gr de SA solide finement pulvérisé (0,8 sat), maintient encore l'agitation pendant 1 heure et demie, puis centrifuge. On rejette la liqueur surnageante ainsi que la pellicule qui flotte à la surface du liquide, puis réunit les culots à l'aide d'une spatule, rince les tubes et dissout le précipité (40-45 cm³; mesurer exactement son volume) avec l'eau (80 cm³ au maximum) de lavage des tubes.

La solution brune ainsi obtenue (pH $\sim$ 6) est trouble; on ajuste son pH à 7,5 ($\sim$ 5 cm³ NH₄OH N), ce qui augmente encore sa turbidité; on l'abandonne 1 heure à froid sur secoueuse lente puis centrifuge 10 minutes (2000 g), rejette le culot

¹ Ordre de grandeur de l'activité amylatique de l'extrait brut: 2500 unités/cm³ (amidon Noredux). Le degré de pureté atteint déjà presque le 40% de celui de l'enzyme purifié (Cf. ch. I, § 10-11, p. 137).

cristallin blanc (PO_4^{-3} , NH_4^+ , Mg^{+2} , etc.) et complète le volume de la solution surnageante à 150 cm^3 ¹.

Fractionnement au « Mixed-Salt ».

On dissout 15 g de NaCl pulvérisé ($0,1 \text{ gr/cm}^3$) dans la solution puis ajuste le pH à 7,2, introduit prudemment du SAS jusqu'au « premier trouble persistant » ($\sim 0,45 \text{ sat}$), maintient l'agitation pendant 20 minutes puis centrifuge. On rejette les culots foncés et visqueux ($\sim 5 \text{ cm}^3$) et précipite la solution par une quantité de SAS telle que la teneur finale en agent précipitant soit égale à $0,72 \text{ sat}$. (Tenir compte du SA contenu dans les culots du stade précédent.) Après une demi-heure d'agitation, on centrifuge, écarte la liqueur surnageante, réunit les culots ($\sim 30 \text{ cm}^3$) et les dissout comme précédemment mais dans 30 cm^3 d'eau seulement.

Remarque: Ce fractionnement « au premier trouble » permet de se débarrasser d'une impureté quantitativement peu importante mais pourtant très gênante pour la cristallisation ².

Dialyse

(voir ch. I, § 7, p. 136).

On ajuste le pH de la liqueur obtenue de $\sim 6,7$ à $7,2$ et la dialyse ².

Deuxième fractionnement au « Mixed-Salt ».

On double exactement le volume de la liqueur dialysée avec une solution froide de NaCl saturée à 0°C ($26,28 \text{ gr/100 gr}$ de solution), puis ajuste prudemment le pH à 7,2 par quelques gouttes de $\text{NH}_4\text{OH N}$. Comme au stade précédent, on précipite la solution ($\sim 200 \text{ cm}^3$) jusqu'au premier trouble (qui apparaît généralement vers $0,55 \text{ sat}$), puis, après centrifugation, jusqu'à une concentration finale de $0,72 \text{ sat}$ en SAS ³.

¹ Rendement de la précipitation: 70-75%.

² Le rendement global de ce fractionnement et de la dialyse qui suit est de 80 à 85%.

³ Le rendement de ce stade est de 80 à 85%.

Cristallisation

(voir ch. I, § 8, p. 136).

Pour obtenir une bonne cristallisation, il est nécessaire d'avoir un culot final *très compact*.

Pour réduire le volume de la suspension obtenue après la dernière précipitation, on centrifuge d'abord 15 minutes (2000 g) puis siphonne prudemment les neuf dixièmes de la liqueur surnageante (celle-ci est trouble mais ne contient qu'une fraction négligeable du précipité). Le culot fluide est alors suspendu dans le restant de la liqueur surnageante et transvasé à la pipette dans les tubes de l'ultracentrifugeuse. On soumet le précipité pendant 20 minutes à une centrifugation de 100-150.000 g, éventuellement en plusieurs fois car on a avantage à n'avoir qu'un petit nombre de culots. Ceux-ci sont extraits à la spatule, réunis dans un tube large, en verre épais et dissous *dans un minimum d'eau* (l'eau de rinçage des tubes peut être récupérée mais il vaut mieux ne pas s'en servir pour la dissolution). On obtient finalement une solution¹ visqueuse et très foncée mais qui doit être limpide. On recouvre alors le tube d'un papier-filtre et l'abandonne sur silicagel, à *pression ordinaire*, dans un petit dessiccateur que l'on place sur une secoueuse lente à la chambre froide. Les premiers cristaux apparaissent après environ 24 heures. Trois ou quatre jours plus tard, on bouche le tube et le conserve au frigorifique.

Recristallisation

(voir ch. I, § 9, p. 136).

On lave deux fois les cristaux avec 5 volumes de SA 0,5 sat et M/100 en acétate de Ca (centrifugation: 50-100.000 g) et les dissout dans un minimum d'eau, *sans* élever le pH. On ajoute goutte à goutte du SAS (saturé à froid en acétate de Ca), ce qui provoque une précipitation locale de protéine, que l'on dissout *par agitation* avant d'introduire une nouvelle goutte

¹ Cette solution contient près de la moitié de l'activité amylatique initiale (extrait brut).

de SAS, et ainsi de suite jusqu'à ce que le précipité devienne difficile à dissoudre. La solution d'enzyme doit rester limpide; on l'abandonne sur silicagel comme ci-dessus.

Remarque: La Takadiastase purifiée est encore légèrement colorée. Il est possible de la décolorer à l'aide de BaSO_4 (cf. Décoloration de l' α -amylase de *B. subtilis*, ch. VI, p. 152 et 154 ainsi que ch. VII, 2^o, p. 156-8).

VI. PURIFICATION ET CRISTALLISATION DE L' α -AMYLASE DE *Bacillus subtilis*.

Le matériel de départ est le « Bacterial Amylase Concentrate » de Takamine Laboratory, Inc., Clifton, N.J., U.S.A. Il est stable lorsqu'on le conserve à froid, en récipient hermétique et opaque. *La méthode n'est valable que pour ce produit.*¹

Agent précipitant: SAS contenant 0,5 gr/l d'acétate de Ca, et ajusté à pH 5,0 par H_2SO_4 conc.

*Décoloration*².

Une opération particulière est nécessaire pour débarrasser l'enzyme de l'impureté fortement colorée qui l'accompagne: Traitement de la solution d'amylase par du BaSO_4 précipité *in situ* en présence d'un excès d'ions Ba^{+2} . Le sulfate de baryum fixe la substance colorée, alors que l'enzyme reste en solution.

¹ Nous sommes récemment parvenus à cristalliser l' α -amylase de *B. subtilis* à partir d'un autre produit commercial: la « Biolase » de Kalle (Wiesbaden-Biebrich, Allemagne) en utilisant cette même méthode de purification. Les extraits de « Biolase » formant des solutions extrêmement visqueuses, il faut cependant extraire l'enzyme dans un volume double (600 cm^3) de celui indiqué ici. Le fractionnement qui suit l'extraction se fera par contre à l'aide de SA solide, en présence de 1 gr/e d'acétate de Ca. On obtient finalement près de 2 gr d'enzyme cristallisé par purification. (Cf. R. MENZI et Ed. H. FISCHER, *Helv.*, 37, à paraître.)

² Cf. « Décoloration de l' α -amylase de *B. subtilis* », ch. VII, 2^o, p. 156.

On se sert d'acétate de Ba M/2 que l'on précipite par du sulfate de NH_4 M/2,5 (ajusté à pH 7) à raison de 1 cm³ de SA M/2,5 par centimètre cube de Ba⁺² M/2.

(Remarque: SA M/2,5 = 0,1 sat.)

Horaire.

Veille au soir:	Extraction.
Premier jour:	Précipitation fractionnée au SAS et « Mixed-Salt » precipitation.
Deuxième jour:	Décoloration et dialyse.
Troisième jour:	Cristallisation.

Rendement: Une purification donne environ 1 gr d'enzyme cristallisé.

Rappel: Le chapitre I intitulé « Technique générale des purifications » est un complément *indispensable* à la bonne marche des opérations qui vont suivre.

Extraction

(voir ch. I, § 2, p. 133).

On suspend 60 gr de « Bacterial Amylase » dans 300 cm³ d'acétate de Na M/50, ajuste le pH ($\sim$ 7) à 8,2 au moyen de NaOH N ($\sim$ 10 cm³) et ajoute 10 gouttes de décanol. On extrait l'enzyme en soumettant la suspension à une agitation douce pendant une nuit. Ensuite on centrifuge pendant 1 heure (30.000 g), décante sans entraîner les substances visqueuses qui recouvrent le culot, ajuste le pH de l'extrait brut — qui est brun noir — à 5,0 avec de l'acide acétique N ($\sim$ 15 cm³) et complète avec de l'eau, s'il y a lieu, à 320 cm³.

Fractionnement au SAS

(voir ch. I, §§ 3b, 4b, 5 et 6, p. 134-5).

Les 320 cm³ d'extrait brut ¹ sont précipités par 160 cm³ (0,33 sat) de SAS (contenant 0,5 gr/l d'acétate de Ca, et ajusté à pH 5,0). On maintient l'agitation pendant 15 minutes puis

¹ Ordre de grandeur de l'activité amylatique de l'extrait brut: 20.000 unités/cm³ (substrat: amidon Noredux; cf. ch. I, § 11, p. 137).

centrifuge; les culots sont rejetés ($\sim 10 \text{ cm}^3$) et la liqueur surnageante est précipitée par 160 cm^3 du même agent précipitant (0,5 sat). Après 20 minutes d'agitation, on centrifuge à nouveau, rejette la liqueur surnageante, dissout les culots, mesure leur volume ($\sim 20 \text{ cm}^3$) et porte à 120 cm^3 ¹.

« Mixed-Salt » précipitation.

On ajoute aux 120 cm^3 du stade précédent 120 cm^3 d'une solution froide de NaCl saturée à 0°C (26,28 gr/100 gr de solution), ajuste le pH à 5,0 avec CH_3COOH N puis précipite l'enzyme en ajoutant environ 150 cm^3 de SAS (pH 5) pour obtenir une concentration finale de 0,4 sat (en tenant compte du SA contenu dans le culot du stade précédent). Le premier trouble (« salting out ») apparaît vers 0,2 sat. Après 20 minutes d'agitation, on centrifuge, rejette la liqueur surnageante, dissout les culots, dont on détermine exactement le volume ($\sim 18 \text{ cm}^3$), porte à 200 cm^3 , stabilise la solution en ajoutant quelques gouttes de toluène et d'acétate de Ca 2M et ajuste le pH à 7².

Décoloration.

En procédant comme pour une précipitation au SAS, on introduit dans la solution 200 cm^3 d'acétate de Ba M/2, puis une quantité égale de SA 0,1 sat diminuée de la quantité de SA (exprimée en centimètres cubes de SA 0,1 sat) qui se trouvait déjà en solution.

Exemple: $0,4 \times \text{vol. culots} (\sim 18 \text{ cm}^3) \times 10 = 72$ et $200-72 \cong 128 \text{ cm}^3$ SA 0,1 sat. On maintient l'agitation encore pendant 15 minutes et centrifuge une demi-heure à 25.000 g.³

Dialyse.

On décante la liqueur surnageante ($\sim 500 \text{ cm}^3$) et la dialyse à froid, en présence de quelques gouttes de toluène, pendant

¹ A ce stade (rendement: $\sim 60\%$), l'enzyme est déjà assez pur pour qu'il soit possible de le cristalliser, dans des conditions défavorables, il est vrai.

² Rendement de cette précipitation: $\sim 80\%$.

³ Le rendement global de la décoloration et de la dialyse subséquente est d'environ 80% .

24 heures (sans aplatir le sac à dialyse) contre trois fois 10 l d'eau (0,5 gr/l d'acétate de Ca et 1 cm³/l NH₄OH N; agitation)¹

Cristallisation

(voir ch. I, § 8, p. 136).

Après avoir égoutté le culot acétonique d'enzyme, on introduit quelques gouttes d'eau dans le tube à centrifuger que l'on tient incliné de façon à ce que l'eau ne recouvre pas le culot. On dissout l'enzyme par petites portions, en les triturant successivement dans la solution aqueuse. Chaque fois que celle-ci commence à se troubler, on rajoute quelques gouttes d'eau; après éclaircissement de la solution, on continue la dissolution; lorsque celle-ci est achevée ($\sim$ 1 heure), on ne rajoute plus d'eau mais éclaircit la solution *légèrement* trouble ou opalescente en la soumettant pendant 2-3 minutes à un courant d'air (15-20° C) pour chasser l'acétone. (Volume final: environ 50 cm³).

On transvase à la pipette dans un tube en verre plus petit et élimine s'il y a lieu les dernières traces de BaSO₄ par centrifugation. On accélère la cristallisation en agitant de temps à autres énergiquement la solution avec une baguette de verre que l'on frotte aussi contre les parois du tube.

*Recristallisation*²

(voir ch. I, § 9, p. 136).

Après deux lavages, on dissout le culot cristallin en le suspendant directement dans 3-4 volumes de NH₄OH N/10, puis ramène le pH à 6,8 et ajoute 2 mg/cm³ d'acétate de Ca.

VII. OBSERVATIONS SUR LE COMPORTEMENT DES α -AMYLASES AU COURS DE LEUR PURIFICATION.

1. Stabilisation de l' α -amylase de pancréas de porc.

Bien que les solutions aqueuses de l'enzyme *pur* soient stables entre les pH de 6,5 et 8,5, des traces d'impuretés de

¹ Voir note 3, page précédente.

² Une ou deux recristallisations sont nécessaires pour obtenir un produit qui ne se recolore plus à la longue.

nature multiple peuvent provoquer la désactivation plus ou moins rapide de l'enzyme; or elles ne peuvent être totalement éliminées qu'après recristallisations.

L'adjonction d'une solution d'amylase (à demi purifiée) bouillie et filtrée, stabilise l'enzyme¹, ce qui ne va pas sans inconvénients: apport d'une quantité considérable de substances organiques étrangères et perte d'une partie de l'amylase pour stabiliser le solde. La purification en l'absence de stabilisateur est possible mais délicate².

Nous avons pu remplacer le « jus bouilli » par une *solution M/200 de gluconate de Ca* qui stabilise avantageusement l'enzyme.

La désactivation des solutions impures d'amylase est accélérée lorsque ces solutions sont soumises à la dialyse. Même en présence de Ca^{+2} , la dialyse provoque une certaine désactivation de l'enzyme et la baisse du degré de pureté qui en résulte l'empêche de cristalliser spontanément: on obtient une gelée (qui peut d'ailleurs conserver son activité enzymatique pendant plusieurs mois) qu'il est nécessaire d'amorcer afin de la faire cristalliser.

En traitant la solution d'enzyme avec un échangeur ionique basique (amberlite IR-4b) chargé à l'acétate, on peut éliminer les ions sulfate sans avoir recours à la dialyse. On évite ainsi toutes pertes d'activité et les ions acétate resteront en solution lors de la dernière précipitation acétonique.

2. Décoloration de l' α -amylase de *Bacillus subtilis*.

Les extraits bruts que l'on obtient à partir de concentrés commerciaux d' α -amylase bactérienne sont très fortement colorés en brun noir et les substances responsables de cette coloration (produits résultant de l'oxydation de polyphénols ou d'une « browning reaction » entre hydrates de carbone et composés aminés) ne peuvent être éliminées par des précipitations fractionnées successives. Ces impuretés n'empêchent d'ailleurs nullement la cristallisation de l'enzyme, mais alors,

¹ K. H. MEYER, Ed. H. FISCHER et P. BERNFELD, *Helv.*, 30, 64-78 (1947).

² Ed. H. FISCHER et P. BERNFELD, *Helv.*, 31, 1831-44 (1948).

après dissolution des cristaux, la solution que l'on obtient est tellement colorée qu'elle ne peut être soumise à aucun des examens optiques habituels (électrophorèse, ultracentrifugation, etc.). Des cristallisations répétées sont insuffisantes pour éliminer ces impuretés; elles ne dialysent que faiblement et de plus, l'intensité de la couleur, qui varie d'un produit à l'autre, augmente en général au cours du temps.

Nous avons examiné toute une série de méthodes afin de décolorer l'enzyme. De bons résultats ont été obtenus par chromatographies effectuées en présence de divers adsorbants. Ainsi, en passant des solutions diluées d'enzyme en présence d'acétate de calcium sur de la terre d'infusoire, on peut parfaitement séparer l'amylase — qui migre moins vite — des impuretés colorées. Cependant la dilution à laquelle il faut travailler est telle que cette opération n'est pas réalisable pour les quantités mises en jeu lors d'une purification habituelle.

Par ailleurs, nous avons observé que l'adsorption du produit coloré augmente proportionnellement à la concentration en ions Ca^{+2} présents. Ceci nous a conduit à examiner le pouvoir décolorant des sels insolubles de métaux alcalino-terreux et de fait, nous avons trouvé que les substances colorées sont fortement et sélectivement adsorbées sur les borates, oxalates, phosphates et sulfates de Ca, Sr et Ba. Les meilleurs résultats ont été obtenus à l'aide de *sulfate de baryum que l'on forme — en présence d'un excès d'ions Ba^{+2} — directement dans la solution d'enzyme à décolorer*¹.

Le rendement de cette opération extrêmement simple, très rapide et qui peut se faire sur de grandes quantités d'enzyme, est de l'ordre de 85%, pour une décoloration de plus de 90%. Ce qui reste des impuretés peut maintenant être éliminé par recristallisation de l'enzyme. On obtient finalement des cristaux nacrés, parfaitement incolores².

¹ Ce procédé permet également de décolorer les solutions d' α -amylase d'*Aspergillus oryzae*.

² Lorsque la décoloration a été insuffisante — par suite de l'emploi d'une trop faible quantité de BaSO_4 ou d'une dilution insuffisante de la solution d'enzyme à décolorer — les eaux-mères de cristallisation se recolorent légèrement à la longue.

La quantité optimum de BaSO_4 à utiliser dépend de l'intensité

L'amylose, débarrassée de la substance colorée, se comporte quelque peu différemment: elle devient beaucoup moins soluble et peut-être un peu moins stable¹.

3. Les cristaux d' α -amylases.

Des quatre amylases, c'est celle de *pancréas de porc* qui permet d'obtenir les cristaux les plus gros (jusqu'à 1-2 mm de long après une très lente cristallisation à partir de solutions relativement diluées); ils polarisent notablement la lumière. (fig. 2, 3 et 4). Par contre, ils ne se conservent pas très bien: s'il est nécessaire de stocker cette amylase pour plus de 2-3 mois, il est préférable de la lyophiliser (cf. chap. I, § 9, p. 137).

Les cristaux d' α -amylase de *salive* sont en général moins allongés et plus réguliers que ceux de l'amylose pancréatique mais il est parfois difficile de les distinguer des premiers (fig. 1).

L'aspect des cristaux d' α -amylase de *B. subtilis* varie passablement d'une cristallisation à l'autre: on obtient tantôt des aiguilles très effilées, de longueur variable, tantôt des cristaux biseautés et terminés en dièdres plus ou moins obtus comme les cristaux des deux amylases animales; ils sont assez friables (fig. 6).

Les cristaux d' α -amylase d'*A. oryzae* ont une forme toute différente et apparemment une énergie de réseau comparative-ment plus faible (contrairement aux trois autres amylases, la présence de sels est indispensable à la cristallisation). Ils sont très transparents; leurs arêtes sont extrêmement nettes et franches (fig. 5).

de la coloration de la liqueur à traiter (pour un volume donné). Un excès de BaSO_4 est à éviter car il entraîne des pertes en enzyme. Les quantités de BaSO_4 indiquées dans la purification de *B. subtilis* donnent des résultats satisfaisants, bien que l'intensité de la coloration varie d'une fois à l'autre. Mais il est évident que pour obtenir une décoloration dans des conditions *optimums*, il faudrait chaque fois déterminer la quantité la plus favorable de BaSO_4 à utiliser, au moyen de quelques essais préliminaires rapides sur 1 à 2 cm³ de solution d'enzyme.

¹ Lorsqu'on dialyse la solution d'enzyme après traitement au BaSO_4 — opération qui facilite beaucoup sa cristallisation — on perd généralement environ 10% d'activité, alors que la même opération sur des solutions colorées s'effectue sans perte aucune.

PURIFICATION ET CRISTALLISATION D' α -AMYLASES



Fig 1. (150×)
Salive humaine

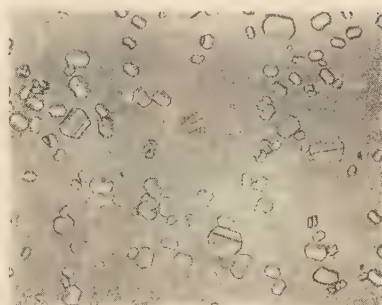


Fig. 2. (125×)
Pancréas de Porc

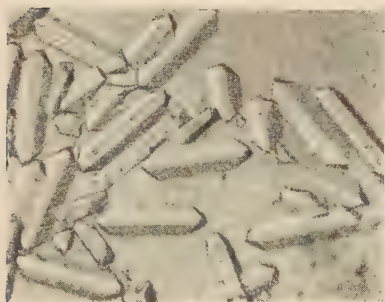


Fig. 3 (165×)
Pancréas de Porc

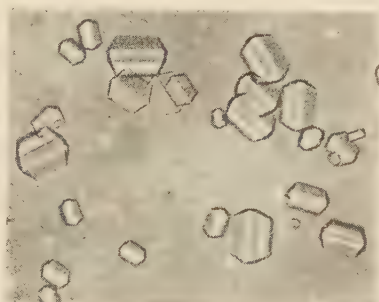


Fig. 4 (150×)
Pancréas de Porc

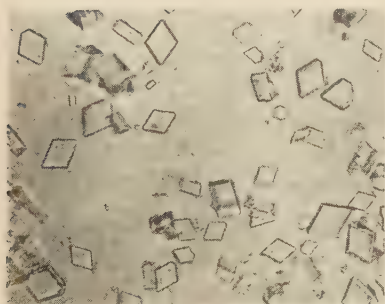


Fig. 5 (150×)
A. Oryzae

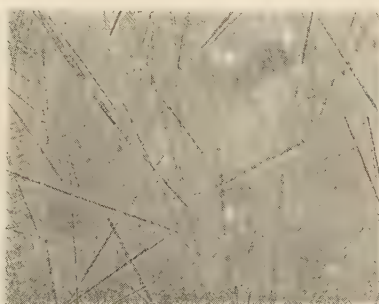


Fig. 6 (150×)
B. Subtilis

Cristaux d' α -Amylase

4. *Activité amylatique des α -amylases.*

L'intérêt principal de l'étude des amylases provient évidemment de ce qu'elles sont des protéines douées d'activité enzymatique. Elles sont de ce fait particulièrement commodes à étudier puisque l'on peut contrôler leur intégrité par un dosage rapide de leur action catalytique (scission des liaisons α -1,4-glucosidiques des polysaccharides du type de l'amidon ou du glycogène).

Pourtant, le dosage d'un enzyme n'a de sens que si l'activité spécifique du produit pur est absolument constante. Est-ce vraiment le cas pour les α -amylases ?

Nous avons constaté — même en travaillant dans des conditions rigoureusement identiques (notamment en ce qui concerne la nature et l'état du substrat en solution) — que bien souvent tout se déroule comme si l'enzyme passait par des états d'activation différents.

Si ces anomalies nous ont davantage frappés à propos des α -amylases végétales, elles ont néanmoins été remarquées par d'autres chercheurs sur l' α -amylase de pancréas *humain*¹.

Au cours de la purification d'une amylase de *B. subtilis* d'origine différente de la nôtre, des « masquages » presque complets de l'activité à certains stades ont été signalés², activité qui réapparaissait au cours des opérations ultérieures. Des phénomènes de ce genre se produisent également avec de l' α -amylase purifiée: aussi ne s'agit-il pas simplement de l'action de certaines impuretés qui fausseraient les dosages.

D'autres observations semblent indiquer qu'en solution concentrée, l'enzyme ne se trouve pas toujours dans un état d'activité maximum. Lors de la dilution, il y aurait d'abord augmentation progressive de l'activité enzymatique, puis, avec des dilutions croissantes et à la longue, désactivation progressive. De sorte qu'il faudrait envisager un optimum d'activité qui serait fonction non seulement de la concentration de l'enzyme mais encore du temps.

¹ Ed. H. FISCHER, F. DUCKERT et P. BERNFELD, *Helv.*, 33, p. 1061 (1950).

² Ed. H. FISCHER et R. MENZI, à paraître dans *Helv.*, 37.

Pour les dosages d'activité, les dilutions sont souvent de l'ordre de 1 à 10.000. Or on obtient généralement des résultats très différents selon que l'on dilue l'enzyme brusquement (0,1 cm³ dans 1 litre) ou par étapes (4 $\times$ 1: 10). Il est possible que ceci résulte du fait que l'enzyme est sensible aux « effets de surface » dûs aux parois des récipients. Dans ce cas, l'effet serait d'autant plus marqué que le rapport « surface des parois/volume du diluant » serait plus grand.

On voit donc que les dosages d'activité sont moins simples à interpréter qu'on ne l'a cru. S'il est généralement possible d'obtenir des valeurs comparatives sur la quantité d' α -amylase présente à un stade donné lors de deux purifications successives (à condition d'effectuer les dosages à plusieurs reprises et toujours exactement dans les mêmes conditions), il est déjà plus aléatoire de vouloir comparer le degré de pureté (c'est-à-dire déterminer l'« enrichissement ») de l'enzyme au cours de la purification. De même, les comparaisons entre activités spécifiques d' α -amylases différentes ne peuvent être faites que sous toutes réserves.

RÉSUMÉ.

Quatre « routine-methods » dérivant d'une même technique générale sont décrites en détail. Elles permettent de purifier et de cristalliser les α -amylases de salive humaine, pancréas de porc, *Aspergillus oryzae* et *Bacillus subtilis*, sans avoir recours à des cristaux d'amorçage.

Chaque purification ne nécessite que deux à trois jours de travail.

La quantité de cristaux que l'on obtient correspond à environ 1 gr de protéine sèche dans le cas du pancréas, de l'*Aspergillus* et du *B. subtilis*; à 0,15 gr dans le cas de la salive.

Les purifications ne comportent que des opérations simples pour lesquelles les conditions les meilleures ont été systématiquement étudiées (concentration en protéines, teneur en sels, température, pH, durée de précipitation, mode d'adjonction de l'agent précipitant, vitesse d'agitation et de centrifugation, etc.).

Les avantages et les inconvénients des quatre purifications sont passés en revue et le comportement des diverses α -amylases au cours de leur purification est décrit.

*Université de Genève.
Laboratoires de Chimie organique
et inorganique.*

